

УДК 593.195 : 595.782

**ВЛИЯНИЕ МИКРОСПОРИДИИ *VAIRIMORPHA EPHESTIAE*
(MICROSPORIDIA: BURENELLIDAE) НА АКТИВНОСТЬ
И СПЕКТР НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭСТЕРАЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ
ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ПЧЕЛИНОЙ ОГНЕВКИ
GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

© Я. Л. Воронцова, Н. И. Ершов, В. В. Глунов

Изучено влияние микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae) на изменение активности и спектра неспецифических эстераз в гемолимфе, средней кишке и жировом теле личинок *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Спектры эстераз проанализированы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, общую эстеразную активность определяли спектрофотометрически. Обнаружено, что в гемолимфе зараженных насекомых происходит повышение эстеразной активности, и регистрируется экспрессия индуцибельной изоформы фермента. В гомогенатах жирового тела не обнаружено изменений в спектре эстераз у насекомых с признаками микроспоридиоза. В гомогенатах средней кишки инфицированных личинок выявлена деградация изоферментов и зарегистрировано снижение общей эстеразной активности в период массовой спорогонии паразита. Показано, что наибольшая активность эстераз в гемолимфе и тканях средней кишки регистрируется в период вегетативного размножения паразита, а наименьшая — при массовом спорообразовании микроспоридий.

Неспецифические эстеразы в жизнедеятельности насекомых играют важную роль. Они участвуют в формировании резистентности насекомых к инсектицидам, в деградации токсичных метаболитов кормового растения и в метаболизме различных биологически активных веществ, в частности ювенильных гормонов (Jameson et al., 1976; Hooper, 1976; Terriere, 1984; Pateur et al., 2001; Zera et al., 2002). Активность и спектр неспецифических эстераз может изменяться в зависимости от стадии развития, пола, возраста насекомого, вида кормового растения (Кольчевский, Пахомов, 1990; Рославцева и др., 1993; Tan, Guo, 1996; Park, Kamble, 1998). Кроме того, на активность данных ферментов у насекомых могут влиять инфекционные заболевания. Так, при бактериальной инфекции, вызванной *Escherichia coli*, у личинок тутового шелкопряда *Bombyx mori* зарегистрировано повышение активности карбоксилэстераз, а также выявлен индуцибельный изофермент (Shiotsuki, Kato, 1999). Установлено, что инфицирование комаров *Aedes aegypti* арбовирусом Чикугунья сопровождается повышением активности неспецифических эстераз, что обуславливает снижение чувствительности насекомых к инсектицидам (Mourya et al., 1995). Заражение насекомых энтомопатогенными грибами сопровождается появлением индуцибельных эстераз в ге-

молимфе (Серебров и др., 2001), что повышает устойчивость насекомых к инсектицидам (Серебров и др., 2003). Показано влияние микроспоридий на активность эстераз у гусениц озимой совки *Agrotis segetum*. При этом обнаружено, что эстеразная активность в брюшных нервных цепочках личинок увеличивается от момента внедрения микроспоридии *Vairimorpha antheraeae* в ткани хозяина до начала спорогонии (Ефименко, 1989; Yefimenko et al., 2001). Результаты исследования эстеразной активности у сверчка *Gryllus bimaculatus* при микроспориidioзе продемонстрировали ингибирование активности ферментов в гемолимфе, гемоцитах и жировом теле зараженных насекомых. Предполагается, что одним из следствий общего снижения активности эстераз является повышение титра ювенильного гормона (Соколова, Сундуков, 1999).

Настоящее исследование ставит своей целью выявить влияние микроспоридии *V. ephestiae* на спектр и активность неспецифических эстераз в гемолимфе, средней кишке и жировом теле личинок на различных этапах развития микроспориidioза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований служили личинки большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) из лабораторной популяции. Насекомых содержали на искусственной питательной среде при 28 °C в темноте (Тамарина, 1987). В экспериментах использовали микроспоридию *Vairimorpha ephestiae* Mattes (Microsporidia: Burenellidae), выделенную из мельничной огневки *Ephestia kuehniella*, и инфекционную для пчелиной огневки *G. mellonella* (Weiser, Purrini, 1985; Воронцова и др., 2004). Споры *V. ephestiae* были любезно предоставлены Ю. Я. Соколовой (ВНИИЗР, Санкт-Петербург).

Экспериментальное заражение насекомых. Гусениц третьего возраста *G. mellonella* (на следующий день после линьки) заражали перорально спорами *V. ephestiae* — насекомых погружали на 1 с в водную суспензию спор (10^5 спор \times мл⁻¹) или в дистиллированную воду (контрольная группа личинок), после чего помещали на искусственную питательную среду. Развитие микроспориdioзной инфекции контролировали в гемолимфе и тканях с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Отбор гемолимфы и приготовление гомогенатов внутренних органов. Гемолимфу личинок *G. mellonella* отбирали в пробирки Эппендорфа на ледяную баню. Для предотвращения меланизации гемолимфы в пробирки насыпали несколько кристаллов фенилтиомочевина. Гемолимфу центрифугировали при 4 °C в течение 5 мин при 500 g, после чего гемоциты удаляли, а свободную от клеток гемолимфу использовали для изучения спектра и определения активности неспецифических эстераз. Для приготовления образцов для электрофореза гемолимфу от 5—7 личинок отбирали в антикоагулирующий буфер (АБ) при 4—6 °C. АБ готовили согласно Содерхоллу и Смитту (Söderhäll, Smith, 1983) с модификациями. Буфер содержал: 0.14 M NaCl, 0.1 mM глюкозу, 0.03 mM цитрат натрия, 0.026 mM лимонную кислоту, 10 mM ЭДТА, 1 mM PMSF, 0.03 % тритона X-100, 5 mM ФТМ.

Для приготовления гомогенатов внутренних органов личинок препарировали в 0.1 M Na-фосфатном буфере (pH 7.2) (ФБ). Извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным АБ (в случае приготовления образцов для нативного электрофореза) или с холодным ФБ (в случае

приготовления образцов для спектрофотометрии) в соотношении 0.06 г гомогената ткани на 1 мл буфера. Затем гомогенаты центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 10 000 g. Полученный супернатант использовали для определения ферментативной активности. Для одной повторности использовали 5 личинок.

Множественные формы эстераз выявляли в 7.5%-ном полиакриламидном геле с использованием трис-глицинового буфера pH 8.0 (Laemmli, 1970) с 0.1%-ным тритоном X-100. По окончании электрофореза гель инкубировали в субстратах, содержащих 50 мл ФБ, 5 мг 1-нафтилацетата, 10 мг 2-нафтилацетата, 5 мг 1-нафтилпропионата и 25 мг прочного синего РФ (Корочкин и др., 1977). Инкубацию геля в субстратах проводили в темноте при 28 °С в течение 15 мин. Эстеразы, гидролизующие 1-нафтилацетат и 1-нафтилпропионат, представляли собой полосы черного цвета на окрашенной электрофоретической пластинке. Полосы эстераз, окрашенные в красный цвет, гидролизуют 2-нафтилацетат (Lapenta et al., 1995).

Спектрофотометрическое определение активности эстераз в гемолимфе и гомогенатах жирового тела и кишечника проводили по Асперену (Asperen, 1962) с незначительными изменениями. Инкубационная смесь содержала 1 мл 0.54 мМ 1-нафтилацетата в ФБ и 15 мкл опытного образца. После инкубации в темноте в течение 30 мин при 30 °С реакцию останавливали путем добавления 0.25 мл красяще-фиксирующего раствора (0.25 % прочного синего РР и 3.125 % додецилсульфата натрия в ФБ). Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности (A_{600}) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Концентрацию белка в гемолимфе и в гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента ($p < 0.05$) (Плохинский, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы *G. mellonella*. В результате изучения спектра множественных форм неспецифических эстераз гемолимфы личинок *G. mellonella* было выявлено, что эстеразы, гидролизующие 1-нафтилацетат и 1-нафтилпропионат, обладали наибольшей электрофоретической подвижностью и представляли собой полосы черного цвета на окрашенной электрофоретической пластинке. Изоформы эстераз, характеризующиеся низкой электрофоретической подвижностью, гидролизуют 2-нафтилацетат. Было установлено, что через 1 и 2 сут после заражения насекомых спорами микроспоридии *V. ephesiae* различия в спектре неспецифических эстераз гемолимфы контрольных и инфицированных личинок отсутствуют. Через 3 сут после заражения в спектре эстераз гемолимфы инфицированных личинок зарегистрировали индуцибельные изоформы IE и IE₁ (рис. 1, а). Более широкий спектр эстераз был выявлен в гемолимфе через 6 сут после начала эксперимента, когда произошла линька насекомых на четвертый возраст (рис. 1). При этом в контроле были зарегистрированы изоформы LE₁ и LE₂ и обнаружено, что в гемолимфе зараженных личинок изоформа IE₁ не является индуцибель-

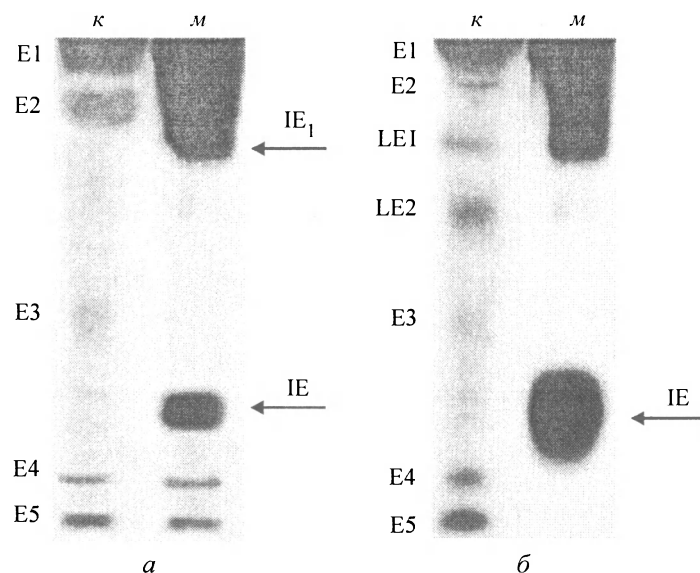


Рис. 1. Спектр эстераз гемолимфы *Galleria mellonella* в норме и при микроспориidioзе.
 а — через 3 сут после заражения микроспоридиями, б — через 6 сут после заражения микроспоридиями. к — контроль (незараженные личинки), м — зараженные личинки.

Fig. 1. Spectrum of hemolymph esterases in *Galleria mellonella* under normal conditions and under microsporidiosis.

ной (рис. 1, б). Экспрессия изоформы IE в гемолимфе усилилась через 6 сут после заражения (визуальная регистрация), вместе с тем изоформы с наибольшей электрофоретической подвижностью E4 и E5 исчезли из спектра эстераз зараженных насекомых (рис. 1, б). Такие изменения в эстеразном спектре гемолимфы инфицированных микроспоридией личинок *G. mellonella* сохранялись весь последующий период наблюдений (до 15 сут после заражения). Оценивая удельную эстеразную активность гемолимфы, мы обнаружили достоверные различия между интактными и зараженными насекомыми на протяжении всего эксперимента (рис. 2). Так, уже через сутки после инфицирования гусениц спорами микроспоридий эстеразная активность в гемолимфе зараженных насекомых повышалась в 1.7 раза. Через 3 сут после заражения, когда в спектре эстераз была выявлена индуцибельная изоформа, удельная эстеразная активность в гемолимфе при микроспориidioзе возрастала в 2.1 раза, а через 9 сут — в 4.1 раза по сравнению с контролем. Через 15 сут после заражения уровень эстеразной активности снижался, причем как в гемолимфе инфицированных, так и нативных личинок (рис. 2).

Изменение активности и спектра эстераз жирового тела *G. mellonella*. Спектр неспецифических эстераз жирового тела личинок *G. mellonella* состоит из 7 множественных молекулярных форм. Изоформы, гидролизующие 1-нафтилацетат и 1-нафтилпропионат, зарегистрированы в средней части эстеразного спектра. Остальные изоформы спектра гидролизуют 2-нафтилацетат (рис. 3). На протяжении всего периода наблюдений различий в спектрах эстераз жирового тела зараженных и контрольных личинок не обнаружили (рис. 3). Удельная эстеразная активность в гомогенатах жирового тела инфицированных микроспоридиями насекомых достоверно не отличалась от контроля в течение 9 сут опыта. Через 12 сут пос-

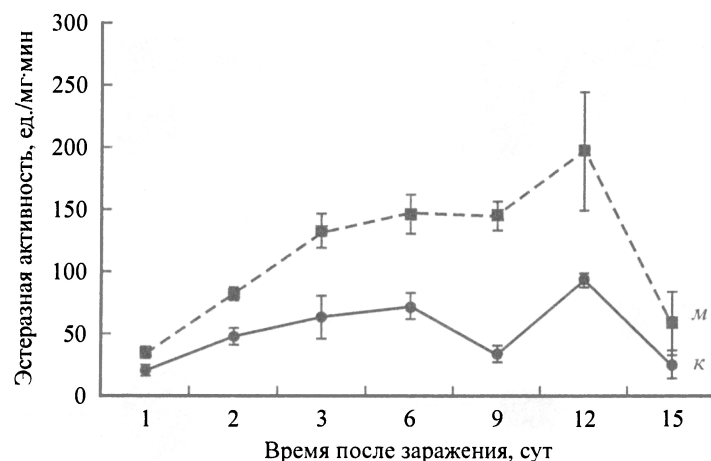


Рис. 2. Изменение эстеразной активности в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* при микро-спориidioзе.

к — контроль; м — личинки, зараженные *V. ephestiae*.

Fig. 2. Alteration of the esterase activity in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae under microspori-diosis.

ле заражения было зарегистрировано увеличение эстеразной активности в 1.3 раза в жировом теле инфицированных гусениц (рис. 4). Через 15 сут удельная активность эстераз в гомогенатах жирового тела как контрольных, так и зараженных насекомых резко снизилась (до 1.5 и 3.4 условных единиц ферментативной активности соответственно) (рис. 4). В этот же период наблюдений зарегистрировали деградацию 3 изоформ эстеразного спектра жирового тела как в контроле, так и при микроспориidioзе (рис. 3, б).

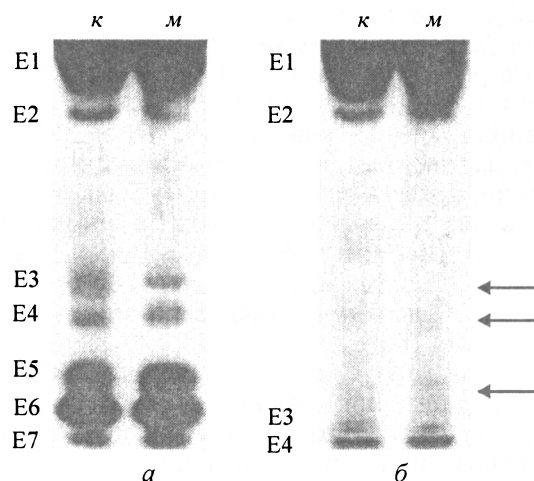


Рис. 3. Спектр эстераз гомогенатов жирового тела *Galleria mellonella* в норме и при микроспориidioзе.

а — через 3 сут после заражения микроспориidiaми, б — через 15 сут после заражения микроспориidiaми. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Spectrum of esterases in fat body homogenates of *Galleria mellonella* under normal conditions and under microspori-diosis.

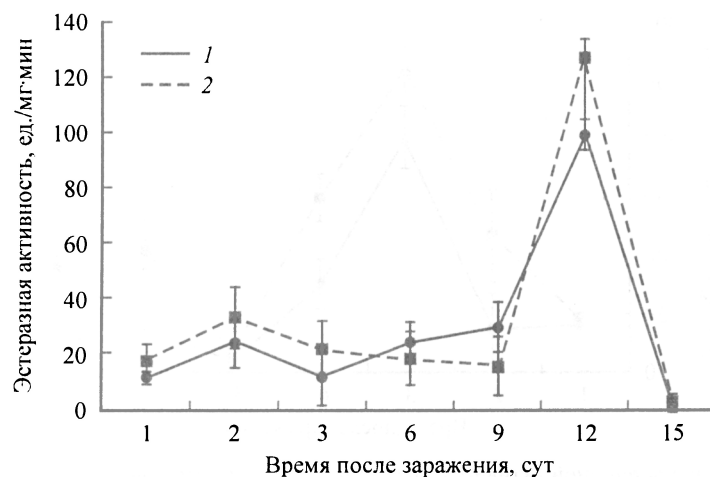


Рис. 4. Изменение эстеразной активности в жировом теле *Galleria mellonella* при микроспориidioзе.

1 — контроль; 2 — личинки, зараженные *V. ephestiae*.

Fig. 4. Alteration of the esterase activity in fat body of *Galleria mellonella* under microsporidiosis.

Изменение активности и спектра эстераз средней кишки личинок *G. melonella*. Через сутки после заражения зарегистрировано 7 изоформ в спектре эстераз средней кишки как контрольных, так и зараженных микроспоридиями гусениц (рис. 5, а). Через 2 сут после заражения в эстеразном спектре обнаружено 8 множественных форм эстераз (рис. 5, б). За исключением двух изоформ средней части спектра, множественные формы эстераз гидролизуют 2-нафтилацетат. Такая картина на-

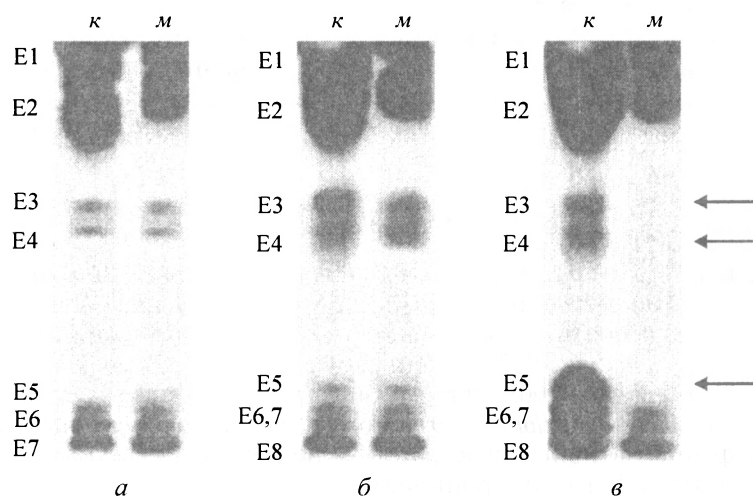


Рис. 5. Спектр эстераз гомогенатов средней кишки *Galleria mellonella* в норме и при микроспориidioзе.

а — через 1 сут после заражения микроспоридиями, б — через 2 сут после заражения микроспоридиями, в — через 15 сут после заражения микроспоридиями. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 5. Spectrum of esterases in midgut homogenates of *Galleria mellonella* under normal conditions and under microsporidiosis.

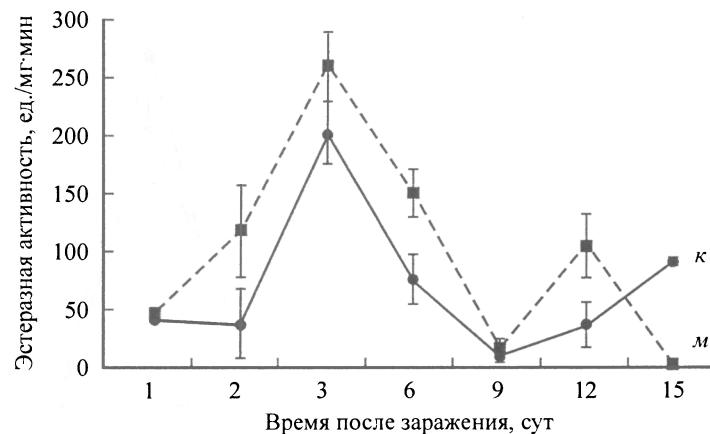


Рис. 6. Изменение эстеразной активности в средней кишке *Galleria mellonella* при микроспориidioзе.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 6. Alteration of the esterase activity in midgut of *Galleria mellonella* under microsporidiosis.

блюдалась до 15 сут после заражения насекомых. При этом различия между нативными и инфицированными личинками не выявлены. Через 15 сут после заражения микроспоридиями в фазу массового спорообразования зарегистрирована деградация 3 изоформ в спектре эстераз средней кишки зараженных гусениц (рис. 5, в).

Достоверные различия в уровне удельной эстеразной активности между контрольными и инфицированными насекомыми не были обнаружены на 1, 3 и 9 сут эксперимента. Тем не менее выявлена тенденция к повышению активности эстераз в средней кишке зараженных насекомых. Так, через 2, 6 и 12 сут после инфицирования уровень эстераз был выше по сравнению с контролем в 3.2 ± 1.3 , 2.0 ± 1.0 и 2.8 ± 1.3 раза соответственно. Через 15 сут после заражения показатели общей эстеразной активности личинок с признаками микроспориidioза резко снижались по сравнению с интактными насекомыми и составляли 3.2 ± 1.7 и 92.1 ± 3.3 соответственно (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в гемолимфе нативных личинок *G. mellonella* были обнаружены 4 множественные формы эстераз, гидролизующие 1-нафтил-ацетат, которые, вероятно, принимают участие в дезактивации бактериальных токсинов (Lysenko, 1972). Наши исследования, также как и исследования Сереброва и др. (2001), продемонстрировали более широкий спектр эстераз гемолимфы *G. mellonella*. Это может быть связано с использованием различных ферментативных субстратов — не только 1-нафтилацетата, но и 2-нафтилацетата и 1-нафтилпропионата.

Наибольшие изменения в спектре и активности эстераз при микроспориidioзе, вызываемом *V. ephesiae*, были зарегистрированы в гемолимфе зараженных личинок. Мы обнаружили индуцибельную изоформу эстераз в гемолимфе инфицированных насекомых, которая, вероятно, участвует в детоксикации эндотоксинов, появляющихся при нарушении функционирования или разрушении клеток хозяина в результате развития микроспоридий.

Возможно, поэтому мы зарегистрировали достоверное повышение общей эстеразной активности в гемолимфе личинок, зараженных микроспоридией *V. ephestiae*. Результаты наших исследований согласуются с данными других авторов, которые показали, что инфицирование насекомых энтомопатогенами приводит к появлению индуцибельных эстераз и повышению общей эстеразной активности в гемолимфе. В частности, обнаружено, что заражение личинок *G. mellonella* энтомопатогенными грибами приводит к индукции изоформ эстераз и увеличению общей активности эстераз в гемолимфе зараженных насекомых (Андросов, Алиева, 1980; Серебров и др., 2001). При изучении роли эстераз при патогенезах было показано, что индуцибельные эстеразы гемолимфы личинок *Bombyx mori* принимают участие в элиминации токсических молекул у насекомых, зараженных бактериями (Shiotsuki, Kato, 1999). Необходимо отметить, что при микроспориidioзе сверчка *Gryllus bimaculatus*, инфицированного *Nosema grylli*, было зарегистрировано ингибирование эстеразной активности в гемолимфе зараженных насекомых (Соколова, Сундуков, 1999). Авторы полагают, что одним из следствий общего снижения эстераз, участвующих в деградации ювенильного гормона, может быть повышение титра ювенильного гормона и наблюдаемая «ювенилизация» зараженных особей, обнаруженная при микроспориidioзе. Снижение эстеразной активности и деградация двух молекулярных изоформ эстераз были выявлены в брюшных нервных цепочках личинок озимой совки *Agrotis segetum*, зараженных микроспоридиями (Yefimenko et al., 2001). Авторы также связывают это с изменением титра ювенильного гормона, поскольку паразиты способны синтезировать этот гормон. По поводу последнего факта в литературе имеются противоположные мнения. Было показано, что микроспоридии индуцируют накопление ювенильного гормона у хозяина в последних личиночных возрастах, вероятно, удлиняя тем самым сроки развития хозяина (Fisher, Sanborn, 1962, 1964). Однако Милнер (Milner, 1972) не смог подтвердить результаты этих авторов, а Линде и Хенн (Linde, Henn, 1993) сообщили о недостоверных различиях в титре ювенильного гормона между контрольными и зараженными микроспоридией *Vairimorpha* sp. личинками двух видов чешуекрылых — *Plutella xylostella* и *G. mellonella*. Исходя из этого, мы полагаем, что изменение эстеразной активности у личинок большой пчелиной огневки при микроспориidioзе не связано с деятельностью ювенильного гормона и эстеразами ювенильного гормона, которые охарактеризованы у некоторых насекомых (Gu, Zera, 1994; Hinton, Hammock, 2001).

Наиболее высокий уровень повышения активности эстераз в гемолимфе был обнаружен, когда преобладающей стадией развития *V. ephestiae* в жировом теле хозяина были меронты и споронты. Вероятно, повышенная общая эстеразная активность и экспрессия дополнительного изофермента в гемолимфе способствует большей устойчивости насекомых к ксенобиотикам различной природы, обеспечивая возможность благоприятного развития паразита. Было удивительно, что в этот период в клетках жирового тела, которые являются местом развития и размножения микроспоридий, мы не регистрировали изменений эстеразной активности по сравнению с контролем. Возможно, в процессе коэволюции паразита и хозяина были выработаны механизмы, позволяющие ингибировать детоксицирующие ферменты клеток-мишеней в период вегетативного размножения микроспоридии. Известно, что начало инвазии характеризуется не только отсутствием видимых патологических изменений клеток хозяина под воздействием паразита, но и стимуляцией роста клеток хозяина. Антагонистические взаимоотношения

между микроспоридиями и хозяином на ранних этапах патогенеза являются «завуалированными» (Roberts et al., 1967).

При изучении спектра эстераз средней кишки личинок капустной совки *Barathra brassicae*, зараженных микроспоридией *Vairimorpha antheraeae*, было показано подавление некоторых изоформ эстераз во время развития вегетативных стадий микроспоридий (Кольчевская, Кольчевский, 1988). Мы также зарегистрировали достоверное снижение общей эстеразной активности по сравнению с контролем и деградацию спектра эстераз средней кишки, но только через 15 сут после заражения, т. е. при спорогонии *V. ephestiae*. Возможно, такие различия связаны не только с видовыми особенностями паразитов и хозяев, но и с тем, что в эксперименте с капустной совкой использовали изолят микроспоридий с высокой степенью патогенности. Подавление эстеразной активности в тканях средней кишки может быть результатом снижения общего метаболизма в острой фазе болезни. Аналогичные данные были получены при изучении влияния микроспоридий на эстеразную активность в различных тканях хозяина других видов насекомых (Соколова, Сундуков, 1999; Yefimenko et al., 2001).

Таким образом, показано, что заражение личинок *G. mellonella* микроспоридией *V. ephestiae* приводит к изменению активности и спектра эстераз в гемолимфе и средней кишке зараженных насекомых. Наибольшая активность эстераз регистрируется в период вегетативного размножения паразита, а наименьшая — при массовом спорообразовании микроспоридий. При этом в гемолимфе происходит повышение активности эстераз и регистрируются индуцибельные изоформы. В средней кишке инфицированных личинок обнаруживаются снижение эстеразной активности и деградации 3 изоформ в период массовой спорогонии паразита в клетках хозяина.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 03-04-48310, междисциплинарный интеграционный грант СО РАН № 105.

Список литературы

- Андросов Г. К., Алиева М. И. Защитные реакции гемолимфы насекомых при микотоксикозе // Журн. общ. биол. 1980. Т. 41, вып. 5. С. 726—733.
- Воронцова Я. Л., Токарев Ю. С., Соколова Ю. Я., Глупов В. В. Микроспориоз пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), вызываемый *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae) // Паразитология. 2004. Т. 38, вып. 3. С. 239—250.
- Ефименко Т. М. Биологическое обоснование применения микроспоридий против совок самостоятельно и совместно с бактериальными препаратами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1989. 19 с.
- Кольчевская Е. Н., Кольчевский А. Г. Анализ множественных форм неспецифических эстераз гусениц капустной совки, зараженных микроспоридиями *Vairimorpha antheraeae* // Бюл. ВНИИЗР. 1988. № 71. С. 18—21.
- Кольчевский А. Г., Пахомов А. Н. Множественные формы неспецифических эстераз в онтогенезе капустной совки *Barathra brassicae* L. // Онтогенез. 1990. Т. 21, № 6. С. 580—584.
- Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
- Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
- Рославцева С. А., Баканова Е. И., Еремина О. Ю. Эстеразы членистоногих и их роль в механизмах детоксикации инсектоакарицидов // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 3. С. 368—375.

- Серебров В. В., Алексеев А. А., Глухов В. В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 588—592.
- Серебров В. В., Киселев А. А., Глухов В. В. Изучение некоторых факторов синергизма между энтомопатогенными грибами и химическими инсектицидами // Микол. и фитопатол. 2003. Т. 1, № 37. С. 76—82.
- Соколова Ю. Я., Сундуков О. В. Подавление активности эстераз как особенность патогенеза микроспориоза сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 6. С. 527—536.
- Тамарина Н. А. Техническая энтомология — новая отрасль прикладной энтомологии // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Энтомология. 1987. Т. 7. С. 248.
- Asperen K. van. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method // Journ. Insect Physiol. 1962. Vol. 8. P. 401—416.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248—254.
- Fisher F. M., Sanborn R. C. Production of insect juvenile hormone by the microsporidian parasite *Nosema* // Nature. 1962. Vol. 194. P. 1193.
- Fisher F. M., Sanborn R. C. *Nosema* as a source of juvenile hormone in parasitized insects // Biol. Bul. 1964. Vol. 126. P. 235—252.
- Gu X., Zera A. J. Developmental profiles and characteristics of haemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis* // Comp. Biochem. Physiol. 1994. Vol. 107. P. 553—560.
- Hinton A. C., Hammock B. D. Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta* // Insect. Biochem. Mol. Biol. 2001. Vol. 32. P. 57—66.
- Hooper G. H. S. Esterase mediated hydrolysis of naphtyl esters, malathion, methoprene, and cecropia juvenile hormone in *Culex pipiens pipiens* // Insect Biochem. 1976. Vol. 6. P. 255—266.
- Jameson G. W., MacFarlane J. R., Hogan T. W. Esterases in relation to embryonic diapause in the field cricket, *Teleogryllus commodus* // Insect Biochem. 1976. Vol. 6. P. 59—63.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680—685.
- Lapenta A. S., de Campos Bicudo H. E. M., Ceron C. R., Cordeiro J. A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster // Cytobios. 1995. Vol. 84. P. 13—29.
- Linde A., Henn M. Juvenile hormone determination in healthy and microsporidia-infected larvae of lepidoptera // Proceedings of 26th Ann. Meeting of the Soc. for Invertebrate Pathology, Ashville, NC. 1993. P. 99.
- Lysenko O. Some characteristics of *Galleria mellonella* hemolymph proteins // Journ. Invertebr. Pathol. 1972. Vol. 19. P. 335—341.
- Milner R. J. *Nosema whitei*, a microsporidian pathogen of some species of *Tribolium*. I. Morphology, life cycle, and germination time // Journ. Invertebr. Pathol. 1972. Vol. 19. P. 231—238.
- Mourya D. T., Hemingway J., Leake C. J. Post-inoculation changes in enzyme activity of *Aedes aegypti* infected with Chikungunya virus // Acta Virol. 1995. Vol. 39. P. 31—35.
- Park N. J., Kamble S. T. Comparison of esterases between life stage and sexes of resistant and susceptible strains of german cockroach (Dictioptera: Blattellidae) // Journ. Econ. Entomol. 1998. Vol. 91. P. 1051—1057.
- Pasteur N., Nance E., Bons N. Tissue localization of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // Journ. Med. Entomol. 2001. Vol. 38. P. 791—801.
- Roberts P. A., Kimball R. F., Pavan C. Response of *Rhynchosciara* chromosomes to microsporidian infection: increased polyteny and generalized puffing — Exper. Cell Res. 1967. Vol. 47. P. 408—422.
- Shiotsuki T., Kato Y. Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. coli* infection // Insect Biochem. Mol. Biol. 1999. Vol. 29. P. 731—736.
- Söderhäll K., Smith V. J. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods // Dev. Comp. Immunol. 1983. Vol. 7. P. 229—239.
- Tan W.-J., Guo Y.-Y. Effects of host plant on susceptibility to deltamethrin and detoxication enzymes of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) // Journ. Econ. Entomol. 1996. Vol. 89. N 1. P. 11—14.

- Terriere L. C. Induction of detoxication enzymes in insects // Ann. Rev. Entomol. 1984. Vol. 29. P. 71–88.
- Weiser J., Purrini K. Light- and electron microscopic studies on the microsporidian *Vairimorpha ephestiae* (Mattes) (Protozoa, Microsporidia) in the meal moth *Ephestiae kühniella* // Arch. Protistenk. 1985. Bd 130. S. 179–189.
- Yefimenko T. M., Sundukov O. V., Issi I. V. Effect of microsporidia infection on the esterases activities in *Agrotis segetum* caterpillars // Vestn. zool. 2001. Vol. 35, N 4. P. 45–50.
- Zera A. J., Sanger T., Hanes J., Harshman L. Purification and characterization of hemolymph juvenile hormone esterase from the cricket, *Gryllus assimilis* // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2002. Vol. 49. P. 41–55.

Институт систематики и экологии животных СО РАН,
Новосибирск

Поступила 25 V 2005

AN EFFECT OF THE MICROSPORIDIAN VAIRIMORPHA EPHESTIAE
(MICROSPORIDIA: BURENELLIDAE) ON ACTIVITY
AND SPECTRUM OF NONSPECIFIC ESTERASES IN DIFFERENT TISSUES
OF THE GREATER WAX MOTH GALLERIA MELLONELLA
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) LARVAE

Ya. L. Vorontsova, N. I. Ershov, V. V. Glupov

Key words: esterase assay, esterase pattern, fat body, hemolymph, midgut, microsporidia, *Galleria mellonella*, *Vairimorpha ephestiae*.

SUMMARY

The effect of the microsporidian *Vairimorpha ephestiae* Matted (Microsporidia: Burenellidae) on nonspecific esterases was studied in hemolymph, fat body and midgut of the larvae of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Esterase patterns were analyzed by the polyacrylamide gel electrophoresis, the total esterase activity was detected spectrophotometrically. The increase of total esterase activity was registered in hemolymph of infected larvae. An overexpression of esterase isozyme in hemolymph was already detected at the 3rd day post infection. No changes in esterases pattern were observed in the fat body's homogenates of the *G. mellonella* larvae possessing the symptoms of microsporidiosis. The degradation of esterase isozymes and the decrease of total esterase activity in the pattern of the midgut homogenates of infected larvae were registered during parasite sporogony. The greatest esterase activity in hemolymph and midgut tissues was registered during vegetative reproduction of parasite, but the least level of esterase activity was observed during mass sporogony of microsporidia.